

**Beeinflussende Faktoren auf die
Biosynthese der Fettsäuren**

Gerhard Wolfrum

Druck: Anneliese Schubert, München 5, Corneliusstraße 21, Telefon 21777

AUS DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄTS-POLIKLINIK MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

BEEINFLUSSENDE FAKTOREN AUF DIE

BIOSYNTHESE DER FETTSÄUREN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gerhard Wolfrum

aus Windisch-Eschenbach



München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. SEITZ

Dekan: Professor Dr. K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 14. April 1959

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

II. METHODIK

1. Experimenteller Teil
2. Darstellung des Enzymsystems
3. Darstellung eines die Fettsäuresynthese aktivierenden "Faktors"
4. Austauschen des Überstandes
5. Inkubation
6. Isolierung der C¹⁴-Fettsäuren
7. Bestimmung der Radioaktivität
8. Atmung und Glykolyse
9. Bestimmung des ATP-Gehaltes
10. Substanzen

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

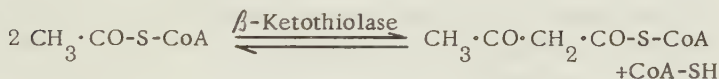
IV. TABELLEN

V. LITERATURNACHWEIS

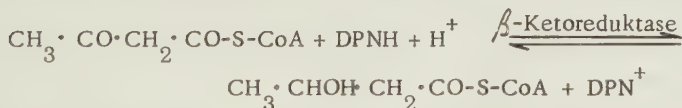
I. E I N L E I T U N G

Die Biosynthese der Fettsäuren bedeutet eine Umkehrung der Knopp'schen β -Oxydation. Nach LYNEN (18) erwiesen sich die Zwischenprodukte als Thioester von Coenzym A. Ausgehend von Acetyl-CoA geschieht die Synthese höherer Fettsäuren durch die Wiederholung eines Kreislaufes von 4 aufeinanderfolgenden Reaktionen (19):

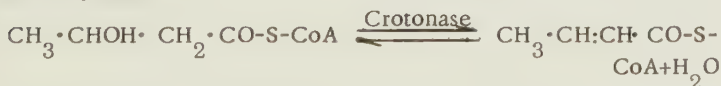
- 1) Der Kondensation von 2 Molekülen Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA und CoA (CoA-SH):



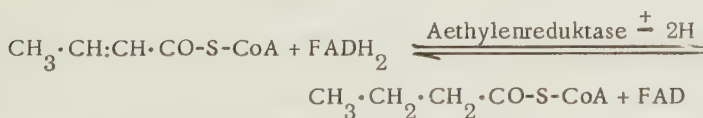
- 2) Der Reaktion des Acetoacetyl-CoA zu β -Hydroxy-butyryl-CoA:



- 3) Der Dehydratisierung des β -Hydroxy-butyryl-CoA zu Crotonyl-CoA:



- 4) Der Reduktion des Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA:



CoA oder CoASH = Coenzym A

FAD bzw. FADH_2 = oxydiertes bzw. reduziertes Flavinadeninindinucleotid

Das gebildete Butyryl-CoA reagiert nun mit einem Zweitmolekül Acetyl-CoA unter Bildung von β -Ketocaproyl-CoA und CoASH usw. Dieser Kreislauf wird 8 mal durchlaufen, bis ein Molekül Stearyl-CoA gebildet ist. Alle 4 Reaktionsschritte sind reversibel. Synthese und Abbau der Fettsäuren stehen in einem Gleichgewicht. Für diesen Prozess wurde der Name Fettsäurezyklus oder Fettsäurespirale geprägt.

Durch Verbindungsbildung zwischen CoASH und der freien Fettsäure entstehen die Coenzym-A-Derivate, die Fettsäure liegt in einer "aktivierten" reaktionsfähigen Form vor. Die Bildung des CoA-Derivates ist eine energieverbrauchende Reaktion. Energiespender ist das Adenosintriphosphat (ATP). Dabei sind zwei Mechanismen wichtig:

- a) Eine Reaktion mit ATP und CoA unter Bildung von A-Acyl-CoA, Adenosinmonophosphat und Pyrophosphat und
- b) eine Überführung des CoA von gewissen Acyl-CoA-Verbindungen wie Acetyl-CoA oder Succinyl-CoA.

Die Synthese von Fettsäuren aus Acetyl-CoA im Fettsäurezyklus ist an verschiedene Fermente gebunden. Die 1. Reaktion wird von β -Ketothiolase (β -Ketoacyl-Thiolase) katalysiert, die zweite durch β -Ketoreduktase (β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase), wobei für dieses Enzym Dihydrodiphosphopyridinnukleotid (DPNH) als Wasserstoffdonator nachgewiesen wurde. Die Fettsynthese ist also von DPN als wasserstoffübertragendes Coferment abhängig. Reaktion 3 benötigt Crotonase (Enoyl-Hydratase) und Reaktion 4 Aethylenreduktase (Acyl-CoA-Dehydrogenase), das wasserstoffübertragende Coferment ist nach LANGDON (17) und SEUBERT (23) TPNH.

Die Höhe der Fettsäuresynthese ist abhängig von der Stoffwechsellage der Tiere. Es ist bekannt, dass im Hunger in hohem Masse Ketokörper gebildet werden(1). HELMREICH und Mitarbeiter (12) nehmen an, dass die Förderung der Lipogenese und die Hemmung der Ketogenese von einem ausreichenden Angebot an Wasserstoffdonatoren (DPNH), die bei der Glykolyse (Triosephosphat-Dehydrierung) anfallen, abhängig ist. In der Leber hungernder Ratten wurde eine Abnahme der DPNH-Konzentration festgestellt und eine Anhäufung von Ketokörpern gefunden. Die Glykolyse ist vermindert. Das heisst also, dass die Ketokörperbildung bei

Hunger (und Diabetes) keinen gestörten Fettabbau bedeutet, sondern einen gestörten Fettsäureaufbau, durch die eingetretene Verminderung der DPNH-Konzentration bedingt. Es besteht also eine Beziehung der Ketokörperbildung zur stationären Konzentration an Pyridin-Cofermenten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einbau von C^{14} -Acetat in höhere Fettsäuren unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Es wurden optimale Bedingungen für die Fettsäuresynthese aus C^{14} -Acetat mit Hilfe eines fettsäuresynthetisierenden Enzymsystems aus Taubenleber beschrieben. Diese Untersuchungen wurden an normal ernährten Tauben und an Hungertieren, sowie an wiedergefütterten und mit Leinsamen gefütterten Tauben durchgeführt, um den Einfluss der Stoffwechsellage auf die Höhe der Fettsäuresynthese zu prüfen. Mit Hilfe eines ausgetauschten von allen Cofaktoren befreiten Systems wurden die verschiedensten Zusätze ausgetestet, die die Höhe der Fettsäuresynthese beeinflussten. Bei der Darstellung des fettsäuresynthetisierenden Enzymsystems wurde in einer Mitochondrienfraktion ein die Fettsäuresynthese steigernder "Faktor" aufgefunden. Die Wirkung dieses "Faktors" auf die Höhe der Fettsäuresynthese im Enzymsystem von normal ernährten Tauben und Hungertauben und von ausgetauschten Enzymsystemen wurde untersucht. Die Atmung und Glykolyse aller Systeme wurden parallel bestimmt.

II. M E T H O D I K

1. Experimenteller Teil

Ein aus Taubenleber gewonnenes Homogenat erwies sich für die Ausführung dieser Untersuchungen als besonders geeignet, da Taubenleber infolge der hohen Aktivität des acetat-aktivierenden Enzyms in grösserem Umfang freies Acetat zu höheren Fettsäuren aufzubauen vermag. Junge 3 - 4 Monate alte Tauben, mit Weizenkörnern reichlich gefüttert, wurden verwendet. Nach BRADY und GURIN (2) und eigenen Versuchen zufolge sah man, dass die zusätzliche Versorgung der Versuchstiere mit reichlich Kohlenhydraten kurz vor dem Töten für gute Ausbeuten der Fettsäuresynthese von Vorteil ist. So wurde den Tieren ein bis zwei Tage vor Versuchsbeginn mehrmals je 5 - 7 ml einer 50 %igen Glukose-lösung, insgesamt 15 g Zucker, in den Kropf instilliert.

Die Tauben wurden durch Scherenschlag dekapitiert, die Leber sofort herausgenommen, mit eiskaltem aqua dest. kurz abgespült und auf dem Filtrierpapier schnell getrocknet, in kleine Stücke zerschnitten und gewogen.

2. Darstellung des Enzymsystems

Für die Darstellung eines löslichen zellfreien Enzymsystems (supernatant fluid) wurde zu einer bestimmten Menge Leber Phosphat-Bicarbonat-Puffer¹⁾ im Verhältnis 1 : 1.5 (1 g Leber entspricht 0.8 ml) zugesetzt und portionsweise ausreichend in der Kälte homogenisiert. Nachdem das Homogenisieren zunächst mit einem Glas-Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM durchgeführt wurde, gingen wir später zum Homogenisieren

1) 0.085 m K_2HPO_4 , 0.009 m KH_2PO_4 , 0.07 m $KHCO_3$ zu gleichen Teilen $p_H = 7.4$.

mit der Hand über, da wir feststellten, dass bei ersterem wahrscheinlich doch durch geringe Wärmeentwicklung das fettsynthetisierende Enzymsystem teilweise zerstört wurde. Das Homogenat wurde niedertourig bei 2000 U/Min. 45 Minuten zentrifugiert. Das Überstehende wurde bei 25000 Touren weitere 10 Minuten zentrifugiert.²⁾ In früheren Versuchen wurde bei diesem letzten Vorgang 30 Minuten zentrifugiert. Es konnte aber festgestellt werden, dass hierbei die Fraktionierung des Homogenats zur Darstellung des fettsäuresynthetisierenden Enzymsystems nicht optimal verlief. Den ziemlich klaren Überstand verdünnte man mit Puffer auf eine Endkonzentration von 3 Teilen Leber und 4 Teilen Puffer und zentrifugierte 1 Stunde bei 25000 x g. Grosse Lebermengen mit kleinen Puffermengen erwiesen sich als nicht günstig. Alle Arbeitsvorgänge wurden bei 0° ausgeführt.

Infolge Fehlens einer präparativen Ultrazentrifuge musste das bei BRADY und GURIN (2) geforderte Abzentrifugieren der löslichen Phase bei 100000 x g unterbleiben.

3. Darstellung eines die Fettsäuresynthese aktivierenden "Faktors"

In einem kleinen Glaszentrifugenglas wurde ein Teil des nach dem letzten einstündigen hochtourigen Zentrifugieren erhaltenen Rückstandes etwa 15 Minuten im kochenden Wasserbad erwärmt und zwar so lange, bis ein festbreiiger, bräunlicher, gerade noch von der Wandung des Glases ablösbarer Niederschlag entstanden war. Dieses Material wurde mit dem aktiven Enzymsystem des Überstandes, sowohl von normalen als auch von ausgetauschten und Hunger-Überstand vermischt und homogenisiert und dieses Homogenat zur Fettsäuresynthese beigelegt. Dabei ging man mengenmässig so vor sich, dass etwa 30 ml Überstand 10 Rückstände ergaben, die dann insgesamt mit 1 ml Puffer homogenisiert wurden. Davon wurden 0,1 ml dem jeweiligen Versuch zugegeben.

2) Runne-Zentrifuge mit Winkelaufsatz, Höchstleistung 25000 U/Min.

4. Austauschen des Überstandes

Durch Behandlung des Überstandes mit einem Anionen-Austauscher, Dowex-1-500 mesh wurde eine definiertere Ausgangslage des fettsäuresynthetisierenden Enzymsystems erhalten. Da einerseits eine zu grosse Menge Austauscher zwar das Enzymsystem weitgehend inaktivierte, eine Reaktivierung durch geeignete Zusätze aber nicht möglich war, andererseits jedoch eine zu geringe Menge nicht ausreichend inaktivierte, musste die günstige Austauschermenge erst herausgefunden werden. Dabei erzielte man mit 400 mg scharf abgesaugtem Austauscher auf 30 ml Überstand die besten Erfolge. Dies entspricht 250 mg bei 105⁰ getrocknetem Material. Nachdem der Überstand mit der optimalen Austauschermenge unter mehrmaligem Umschütteln 5 Minuten im Eisschrank verblieb, wurde er nochmals 10 Minuten hochtourig zentrifugiert und dann in üblicher Menge dem Versuch beigelegt.

5. Inkubation

2.4 ml des Enzympräparates wurden zusammen mit C¹⁴-Na-acetat (oder inaktivem Acetat), MgCl₂, Na-citrat und verschiedenen Cofaktoren (insgesamt 0.6 ml) in einen geeichten Warburg-Trog von ca. 20 ml Volumen eingebracht und 4 Stunden bei 38⁰ ± 0.1 inkubiert. Die verschiedenen Zusätze wie TPN³⁾, TPNH, ATP und Coenzym-A wurden entweder in Substanz oder in MgCl₂-Lösung bzw. Wasser in entsprechender Menge zugegeben. Das Endvolumen betrug stets 3.0 ml, die Endkonzentration der einzelnen zugesetzten Faktoren blieb konstant. Der p_H-Wert der Reaktionslösung wurde auf 7.2 bis 7.4 eingestellt und soll während der 3-stündigen Inkubation annähernd konstant bleiben. Gasphase aerob 100 % O₂, anaerob Argon. Das Gas wurde 10 Minuten eingeleitet, wobei der Gaswechsel pro Trog 1 Liter betrug.

Im allgemeinen war die Zusammensetzung eines Versuchsansatzes folgende:

3) TPN = Triphosphopyridinnucleotid, ATP = Adenosintriphosphat, TPNH = Dihydro-Triphosphopyridinnucleotid

0.4 ml C ¹⁴ -Na-acetat:	0.008 m
0.1 ml MgCl ₂ :	0.006 m
Cytochrom c:	$5 \cdot 10^{-5}$ m (nur aerob)
0.1 ml Na-citrat:	0.01 m
2.4 ml Enzymsystem	

Der Eiweissgehalt des eingesetzten Enzymsystems, bestimmt mit der Biuretmethode im Photometer, betrug im Mittel $35.3 \text{ mg} \pm 2 \text{ mg}$, entsprechend 5.67 mg N .

6. Isolierung der C¹⁴-Fettsäuren

Nach der Inkubation wurden die Versuchsansätze nach den Vorschriften von BRADY und GURIN (2) aufgearbeitet. Die Reaktionsmischung wurde mit 5 ml aqua bidest. in ein birnenförmiges Schliffkölbchen übergespült und zusammen mit 5 ml 30 % alkoholischer KOH und 25 mg Palmitinsäure unter Rückfluss bei gelindem Sieden verseift. (Der Zusatz von Palmitinsäure als Trägersubstanz war notwendig, um bei der späteren Titration fassbare Mengen Fettsäuren vorzufinden.) Nach 4 Stunden Verseifung wurde die abgekühlte Lösung mit 15 - 20 ml Petroläther (Siedepunkt $30 - 50^{\circ}$) in einem Schüttelrichter übergespült und mit etwa 19 % HCL bis zum Umschlag des Indikators Bromkresylgrün-Methylorange angesäuert. Durch viermaliges Ausschütteln mit Petroläther wurden die synthetischen C¹⁴-markierten Fettsäuren aus dem Verseifungsgemisch extrahiert, eingedampft und schliesslich auf 10 ml aufgefüllt. Diese 10 ml enthielten die gesamten aus dem Ansatz isolierten höheren Fettsäuren. Die Menge radioaktiven Acetats, welche allein durch die mechanische Aufarbeitung in den Petrolätherauszug einging, betrug ca. 5.6 % der Aktivität, die man in der Fettsäurerefraktion eines vollaktiven Enzymversuches fand. Dieser "Blindwert" wurde bei der Korrektur der Messwerte berücksichtigt.

7. Bestimmung der Radioaktivität

Die Radioaktivität der im Petroläther vorliegenden höheren Fettsäuren wurde nach der Methode von C. ENTENMAN et al. (9) direkt bestimmt. 1 ml des die Fettsäuren enthaltenden Petrolätherauszuges wurde langsam auf ein mit sogenanntem "Lenspaper" belegtes Aluminiumplättchen mit Rand (Durchmesser 2.5 cm) aufgetropft. Die Messung der Plättchen wurde mit einem β -Fensterzählrohr dünner Belegung (1 mg/cm^2)²⁴ vorgenommen, wobei stets die gleiche Arbeitsspannung und der gleiche geometrische Abstand eingehalten wurde. Die üblichen Korrekturen der Messwerte wurden gemäss den Richtlinien in "Isotopic Carbon" (6) unter Zuhilfenahme einer C^{14} -Standardfolie vorgenommen.

Die gezählte Radioaktivität wurde in Impulsen pro Minute, bezogen auf die 10 ml Petrolätherauszug, die die gesamten isolierten Fettsäuren enthielten, angegeben. Die aus einem Versuchsansatz tatsächlich isolierte Menge an Fettsäuren wurde durch Titration mit $\frac{n}{100}$ alkoholischer NaOH ermittelt. Man fand unter Einrechnung der Trägersubstanz (25 mg Palmitinsäure) durchschnittlich 30 mg Fettsäure.

8. Atmung und Glykolyse

Die Bestimmung der Atmung, also des Sauerstoffverbrauches und der Glykolyse, anaerobe CO_2 -Entwicklung, wurde in bekannter Weise manometrisch in der Warburgapparatur in gleicher Versuchsansätzen gemessen, und zwar die Atmung in 100 %igen O_2 und die Glykolyse in Argon. Das C^{14} -Acetat wurde durch inaktives Acetat ersetzt. Bei der experimentellen Durchführung wurde die umfassende Beschreibung von UMBREIT (21) zu Rate gezogen. Diese angegebenen Werte

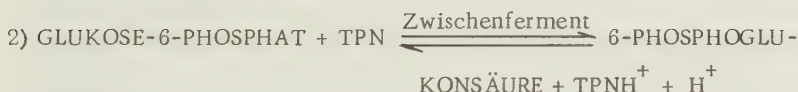
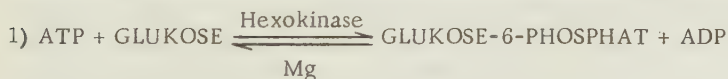
$\times \frac{\text{O}_2}{\text{CO}_2}$ und $\times \frac{\text{N}_2}{\text{CO}_2}$ sind auf 1 ml Enzymlösung berechnet.

4) Geiger-Zählgerät der Fa. Frieske & Höpfner, Erlangen-Bruck

9. Bestimmung des ATP-Gehaltes

Mit Hilfe eines enzymatisch-spektrophotometrischen Testverfahrens wurde der ATP-Gehalt des normalen, des ausgetauschten und des Hungerüberstandes sowie der Gehalt der Leber von normalen und Hungertieren an ATP bestimmt. Diese Bestimmung beruhte auf zwei enzymatischen Reaktionen, die im Prinzip von WARBURG und KORNBERG (22) angegeben wurden.

ATP phosphoryliert Glukose unter dem katalytischen Einfluss der Hexokinase zu Glukose-6-phosphat und Bildung von Adenosindiphosphat (ADP). Das entstandene Glukose-6-phosphat wird mit Triphosphopyridinnucleotid (TPN) und dem Warburg'schen Zwischenferment zu 6-Phosphoglukonsäure und TPNH dehydriert. Die zweite Reaktion ist TPN abhängig.



Aus der Zunahme der TPNH-Absorption kann der Gehalt an ATP exakt ermittelt werden.^{x)}

Der zu untersuchende Überstand oder die Leber als Organ wurde mit 6 % HClO_4 enteiwesst, gut vermischt und hoctourig in der Kälte 10 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit 0.5 n KOH neutralisiert und 10 - 15 Minuten in Eis stehen gelassen, bis sich der gesamte KClO_4 -Niederschlag abgesetzt hatte.

Die Messung erfolgte im Photometer "Eppendorf" bei der Wellenlänge 334 m μ mit vorgesetztem Nickelsulfatfilter. Die verwendeten Küvetten hatten eine Schichtdicke von 1 cm. Die Berechnung erfolgte nach der für optische Teste üblichen Formel.

x) Für die Bereitstellung der Hexokinase danken wir Herrn Priv. Doz.
Dr. W. Lamprecht, TH München

10. Substanzen

Cytochrom-c, elektrophoretisch einheitlich, 80 %ig auf Grund des Eisengehaltes, C.F. Boehringer & Söhne, Mannheim

1-C^{14} -Natriumacetat, Harwell, Radiochemical Centre, England

ATP Serva, Heidelberg

TPN) Sigma, Chemical Company
) 4648 Easton Ave, St. Louis 13

Coenzym A) Missouri, USA

Dowex-1-Austauscher, Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg

Zwischenferment Serva, Heidelberg

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Unter bestimmten Bedingungen konnte mit Hilfe eines fettsäuresynthetisierenden Enzymsystems aus Taubenleber aus C^{14} -Natriumacetat eine ausreichende Fettsäuresynthese erzielt werden. Die Höhe der Fettsäuresynthese wurde hierbei in Impulsen pro Minute pro 10 ml Petrolätherauszug angegeben.

Die Synthesefähigkeit des dargestellten Enzymsystems zeigte dabei eine weitgehende Abhängigkeit vom Ernährungszustand der Tiere. So wurde festgestellt, dass Fermentpräparationen von ausreichend mit Weizenkörnern gefütterten Tauben eine hohe Synthesefähigkeit ergaben (Tab. I). Im Gegensatz dazu fand man bei Tauben, die 72 Stunden gehungert hatten (Hungertauben) unter den gleichen Bedingungen nur eine sehr geringe Ausbeute an höheren Fettsäuren. (Tab. II). Wurden diese Hungertauben wiederum 8 Tage lang reichlich mit Weizenkörnern gefüttert, so zeigten Fermentpräparationen dieser Tauben wieder eine erhöhte Synthesefähigkeit gegenüber den Hungertauben, jedoch immer noch eine verminderte Fettsäuresynthese gegenüber normal ernährten Tauben (Tab. III). In anderen Versuchen wurden Tauben reichlich mit Leinsamenkörnern gefüttert. Dabei zeigte sich, dass die Fähigkeit Fettsäuren zu synthetisieren ungefähr der von Hungertauben entsprach (Tab. IV). Die Annahme, dass diese Tauben gehungert und die Leinsamenkörner nicht gefressen hätten, musste fallen gelassen werden, da bei diesen Tauben bei der Dekapitation im Kropf genügend Leinsamenkörner gefunden wurden. Vermutlich werden bei Leinsamenfütterung keine für die eigene Fettsynthese günstigen Bedingungen vorliegen. Um Einblick in die Enzymsysteme zu bekommen, die bei der Biosynthese von Fettsäuren durch Taubenleberhomogenat aus C^{14} -Acetat eine Rolle spielen, wurde der Überstand mit Dowex-1 (500 mesh) ausgetauscht. Durch diese Behandlung der aktiven Fermentpräparation mit den Austauscher Dowex-1 in optimaler Menge wurde die fettsäuresynthetisierende Aktivität durch Fehlen der notwendigen Cofaktoren auf Werte herabgesetzt, die der minimalen Synthesefähigkeit eines Hungertieres entsprach (Tab. V). Der Dowex-Austauscher ist, als Anionen-

tauscher, imstande, Pyridinnukleotide zurückzuhalten. Man fand im ausgetauschten Überstand den TPN- und DPN-Gehalt so reduziert, dass er mit den üblichen Testverfahren nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Weiterhin war auch der ATP-Gehalt weitgehend vermindert. Diese Hemmung bzw. Aufhebung der Fettsäuresynthesefähigkeit der Fermentpräparationen von Hungertauben, von wiedergefütterten und mit Leinsamen gefütterten Tauben, sowie die des ausgetauschten Enzymsystems konnte in vitro durch entsprechende Zusätze zum Teil reaktiviert werden.

Ergänzte man die ausgetauschten Systeme durch die verschiedensten Cofaktoren in variierender Zusammensetzung, so konnte man folgende Beobachtungen machen. Bei Zugabe von Adenosintriphosphat (ATP) allein zeigte sich, dass bei einer Konzentration von $0,2 \cdot 10^{-3}$ m in der Reaktionslösung eine geringe Aktivierung der durch den Austauschvorgang reduzierten Fettsäuresynthese erfolgte. Bei Erhöhung der Konzentration und zwar auf $0,7 \cdot 10^{-3}$ m stieg die Ausbeute der Fettsynthese von $0,199 \cdot 10^4$ auf $3,168 \cdot 10^4$ (ausgedrückt in Impulsen pro Minute pro 10 ml Petrolätherauszug). Wenn höhere ATP-Mengen $-2,0 \cdot 10^{-3}$ m - verwendet wurden, ergab sich keine wesentliche Förderung der Synthesefähigkeit (Tab. VI). Die Ergebnisse, die durch Ergänzung des ausgetauschten Systems mit steigenden Konzentrationen von ATP erhalten wurden, sind aus Fig. 1 ersichtlich. Sie bestätigen die Notwendigkeit des Vorhandenseins einer bestimmten Menge ATP.

Verwendete man TPN allein, so konnte eine Wiederherstellung der Fettsäuresynthese des ausgetauschten Enzymsystems nicht erzielt werden. Das wies darauf hin, dass die Ergänzung des wasserstoffübertragenden Cofermentes allein nicht genügte.

Eine beträchtliche Steigerung der verminderten Fettsäuresynthesefähigkeit erhielt man jedoch bei Zugabe einer Kombination von Adenosintriphosphat und Triphosphopyridinnukleotid (TPN). Hier muss erwähnt werden, dass eine zu grosse Austauschermenge eine Reaktivierung nicht zuließ, wogegen eine zu geringe Menge nicht ausreichend inaktivierte. Die herausgefundene günstigste Austauschermenge lag bei 400 mg auf 30 ml Überstand.

Im Gegensatz zum ausgetauschten System bewirkte beim normalen Überstand Zusatz von TPN bzw. TPNH allein anstelle von DPN bzw.

DPNH bereits eine höhere Ausbeute an synthetisierten Fettsäuren. Natürlich zeigten ATP in entsprechender Konzentration (Tab. VII) bzw. ATP + TPN (Tab. I) eine erhöhte Fettsäuresynthese.

Die Enzymsysteme von Hungertauben und von mit Leinsamen gefütterten Tauben verhielten sich in der Reaktivierung der Synthesefähigkeit durch Zusätze von ATP + TPN ähnlich. Die verminderte Fettsynthese wurde im geringen Masse gefördert (Tab. II und IV). Die stärkste Reaktivierung des Enzymsystems zeigten die Präparationen der wiedergefütterten Tauben (Tab. III).

Eine interessante Feststellung konnte gemacht werden als man bei der Darstellung des fettsynthetisierenden Enzymsystems aus Lebern gut gefütterter Tauben den beim letzten hochtourigen Zentrifugieren verbleibenden Rückstand untersuchte. Es stellte sich heraus, dass beim Erhitzen dieses Rückstandes im Wasserbad ein "Faktor" gebildet wurde, der die Fettsäuresynthese aller präparierten Fermentsysteme in hohem Masse aktivierte. Über diesen "Faktor" konnten nachfolgende Aussagen gemacht werden. Wurde der "Faktor" in Puffer aufgenommen und anstelle des Enzymsystems mit den üblichen Cofaktoren in den Versuch eingesetzt, so bekam man keine Fettsäuresynthese. Dagegen wurde bei einem normalen Versuchsansatz durch Zugabe des im Leerwert unwirksamen Faktors die Synthesefähigkeit auf das Doppelte erhöht. (Tab. I). Während die Ausbeute an synthetisierten markierten höheren Fettsäuren von Präparationen, die von mit Leinsamen gefütterten Tieren stammten, durch den "Faktor" von $0.174 \cdot 10^4$ auf $0.489 \cdot 10^4$ Imp./Min. gesteigert wurde (Tab. IV), zeigte sich bei den Enzymsystemen von Hungertauben oder bei ausgetauschten Fermentpräparationen eine deutlichere synthesessteigernde Wirkung. Hier erhielt man beim Hungersystem eine etwa sechsfache, beim ausgetauschten System eine zehnfache Steigerung der Ausbeute an synthetisierten Fettsäuren. (Tab. II und V). Vergleich man diese erhöhte Ausbeute an markierten Fettsäuren mit den Werten, die bei Zusatz von ATP + TPN zu den gleichen Fermentpräparationen erzielt wurden, so sah man, dass der "Faktor" eine grössere Steigerung der Synthesefähigkeit bewirkte als ATP + TPN. Setzte man den "Faktor" mit ATP + TPN zu gleicher Zeit in den Versuchsansatz ein, so sah man keine wesentliche Steigerung der Fettsäuresynthese mehr. Bei den einzelnen Enzymsystemen erhielt man folgende Resultate: Das normale System mit einer Aktivität von $1.49 \cdot 10^4$ Imp./Min. zeigte mit Zusatz

von ATP + TPN $1.82 \cdot 10^4$ Imp./Min., bei Zugabe des "Faktors" in üblicher Menge $2.82 \cdot 10^4$ Imp./Min. und gleichzeitiges Einsetzen von "Faktor" plus ATP + TPN $2.92 \cdot 10^4$ Imp./Min., also nur noch eine unwesentliche Steigerung (Tab. I). Ähnliche Ergebnisse lassen sich aus Fig. 2 für das Austauscher-, Hunger- und Leinsamensystem ersehen.

Versuche, den aktivierenden "Faktor" in grösseren Mengen herzustellen und für längere Zeit aufzubewahren, zeigten gute Erfolge. Der "Faktor" wurde in Puffer aufgenommen und bei 0° im Kühlschrank verwahrt. Bei Zimmertemperatur jedoch ging die aktivierende Fähigkeit schneller verloren. Wie aus Tab. VIII ersichtlich, bewirkte der "Faktor" nach 8 Tagen, ebenso wie nach 14 Tagen noch eine beträchtlich erhöhte Fettsäuresynthese.

Beim Dialysieren des im Puffer aufgenommenen "Faktors" in Puffer verblieb der aktivierende Anteil im Rückstand, in dem im Vacuum eingedampften Dialysat war der "Faktor" nicht nachweisbar, im Gegenteil die Fettsäuresynthese wurde gehemmt. Das wurde beim ausgetauschten System nach deutlicher wie bei der normalen Enzympräparation. Diese Herabsetzung der fettsynthetisierenden Fähigkeit wurde nur durch die im eingedampften Dialysat vorhandene hohe Ionenkonzentration bewirkt (Tab. IX).

Die Annahme, dass das aktivierende Agens des "Faktors" durch Vorhandensein von ATP zu erklären wäre, musste fallen gelassen werden, da im "Faktor" selbst kein ATP nachgewiesen werden konnte. Die Absorptionskurve des im Puffer aufgenommenen "Faktors" zeigte ein Maximum bei $260 \text{ m}\mu$, was für die Anwesenheit von Purin- und Pyrimidinbasen sprechen könnte.

Während aus normaler Taubenleber ein "Faktor" hergestellt werden konnte, der die verminderte Fettsäuresynthese von verschiedenen Fermentpräparationen beträchtlich reaktivierte, war es nicht möglich, aus der Leber von Hungertauben oder von wiedergefütterten und mit Leinsamen gefütterten Tauben einen solchen aktivierenden "Faktor" zu präparieren.

Ergänzend muss bemerkt werden, dass eine Reaktivierung durch "Faktor"-Zusatz und auch durch ATP + TPN nicht bei allen Fermentpräparationen möglich war. Erzielte man unter normalen Bedingungen bei der Fettsäuresynthese eine maximale Ausbeute, so bekam man bei Zusatz von

Cofaktoren keine weitere Steigerung mehr, da eine Erhöhung der Fettsäuresynthese aus eingesetztem Acetat nur solange möglich war, soweit die spezifischen fettsäuresynthetisierenden Enzyme in ausreichender Menge vorhanden sind. Der Grad der Steigerung war also weitgehend von der Ausgangsaktivität des fettsäuresynthetisierenden Enzymsystems abhängig. Verwendete man ein als unzureichend erachtetes aktives lösliches Enzymsystem von normal ernährten Tauben, so musste man feststellen, dass sich diese Systeme durch Zusätze der verschiedensten Cofaktoren nur geringfügig oder zeitweise gar nicht aktivieren liessen. Es musste angenommen werden, dass die Enzyme in diesen Enzymsystemen nicht in genügender Menge vorhanden waren. Dasselbe zeigte sich bei Hungertauben und dem ausgetauschten System. Vermutlich zeigten hier nur solche Fermentpräparationen eine Reaktivierung, die vor dem Hungern bzw. vor dem Austauschen eine normale hohe Fettsäuresynthese ergeben hätten. Man muss annehmen, dass diese Systeme die fettsäuresynthetisierenden Enzyme in ausreichender Menge enthielten, da sonst eine Wiederherstellung der Synthesefähigkeit nicht erklärt werden kann.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Auswirkung der Nicotinsäureamid (NA)-Beigabe zu den verschiedensten Cofaktoren auf das fettsäuresynthetisierende Enzymsystem verfolgt. Wie aus Tab. X zu ersehen ist, hemmte Zugabe von NA die Fettsäuresynthese gegenüber dem normalen Fermentsystem. Diese reduzierte Synthesefähigkeit konnte auch durch einen grossen Überschuss von DPN nicht mehr aufgehoben werden. Dasselbe konnte beobachtet werden, wenn zu normalen Enzymsystem ATP + TPN und zusätzlich NA gegeben wurde. Auch hier konnte DPN nicht als Reaktivator wirken (Tab. XI). Zwar konnte der "Faktor" dem NA etwas widerstehen, indem die fettsäuresynthetisierende Wirkung nicht so absank, eine deutliche Hemmung konnte aber auch nicht geleugnet werden (Tab. XII).

Auch beim ausgetauschten normalen Überstand setzte nach Zugabe von ATP + TPN das NA die Synthesefähigkeit des Enzymsystems um ein Viertel herab (Tab. XIII). Man konnte also feststellen, dass NA die Fettsäuresynthese in jeder Beziehung hemmte. Dass jedoch diese Hemmung durch Zusatz von DPN aufgehoben wurde, wie von früheren Autoren (10) berichtet wurde, zeigte sich hierbei nicht.

Um den Einfluss von in vivo zugefügten NA auf die Höhe der Fettsäuresynthese zu prüfen, wurde normal gefütterten Tauben zwölf Stunden und nochmals eine Stunde vor dem Töten je 100 mg NA tief in den Pectoralmuskel injiziert. Zum Vergleich wurde anderen Versuchstieren entsprechend NaCl gespritzt. Dabei ergab sich, dass auch hier im Vergleich zu normal ernährten Tauben die Fettsäuresynthese deutlich gehemmt wurde, während die mit NaCl behandelten Tauben etwa die gleiche Synthesefähigkeit wie Normaltiere zeigten. Setzte man diesem Enzymsystem, die aus mit NA-injizierten Tauben gewonnen wurde, "Faktor" sowie ATP + TPN zu, so ergab sich eine geringe fördernde Wirkung auf die Ausbeute an höheren Fettsäuren, wobei hier ATP + TPN eine bessere Reaktivierung der Synthesefähigkeit zeigten wie der "Faktor". (Tab. XIV)

ATP - TESTE. - Parallel zu den Fettsäuresynthese-Versuchen wurden Bestimmungen stationären ATP-Konzentrationen in Taubenleber unter Berücksichtigung verschiedener Stoffwechsellagen durchgeführt (Tab. XV). Dabei konnte der Gehalt frischer Lebern von gesunden, reichlich ernährten Tauben an ATP zu 469 μ /g Leber angegeben werden. (Mittelwert aus 4 Versuchen). Verglich man die normalen Kontrollwerte mit den Analysendaten der Lebern von Versuchstieren gleicher Species, die 72 Stunden gehungert hatten, so ergab sich, dass der Gehalt der Leber an ATP nur noch 185 μ /g Leber betrug. Man konnte ausserdem beobachten, dass bei Tauben, die normal ernährt wurden, deren Leber aber aus Gründen, die nicht bekannt sind, eine schlechte Fettsäuresynthese ergaben, der Gehalt an ATP reduziert war. So konnte in gewisser Weise der ATP-Gehalt des Enzymsystems - das Vorhandensein der spezifischen Enzyme der Fettsäuresynthese vorausgesetzt - als Mass für die Höhe der zu erwartenden Synthesefähigkeit verwendet werden.

Bei der Messung des ATP-Gehaltes des Versuchsansatzes vor der Inkubation und nach der Inkubation beobachtete man deutliche Unterschiede. Während bei ersterem noch 291 μ ATP/ml Versuchsansatz vorhanden waren, zeigte sich nach der Inkubation nur noch ein Wert von 36 μ /ml.

Im normalen Überstand wurde ein ATP-Gehalt von etwa 185 μ /ml gefunden, während er beim ausgetauschten System auf einen Wert von 46 μ /ml reduziert war. Ein ähnliches Absinken des ATP-Gehaltes auf

35 μ /ml stellte man beim Überstand von Hungertauben fest. Liess man normalen Überstand bei Zimmertemperatur stehen, so beobachtete man im Laufe von Stunden ein Absinken des ATP-Gehaltes. Während er bei normalem Überstand nach 24 Stunden etwa 16 μ /ml betrug, war er beim Überstand von Hungertauben nach derselben Zeit schon auf 0 abgesunken.

ATMUNG und GLYKOLYSE. - Weiterhin wurde die Atmung und Glykolyse im ausgetauschten Enzymsystem zum Vergleich zum normalen Überstand bestimmt. Dabei stellte man folgendes fest: im ausgetauschten System, das eine deutliche Hemmung der Fettsynthese zeigte, war in gleichem Masse die Glykolyse um ungefähr ein Viertel vermindert, während die Atmung im ausgetauschten System gegenüber dem normalen System nur gering herabgesetzt wurde (Tab. XVI). Der "Faktor" erhöhte die Glykolyse des normalen Überstandes um etwa das Doppelte, während die Steigerung beim ausgetauschten System etwa das Fünffache betrug. Nicht in gleichem Masse erhöhte ein Zusatz von ATP + TPN die Glykolyse bei beiden Systemen. Während beim gewöhnlichen Überstand die Glykolyse nicht wesentlich erhöht wurde, zeigte das ausgetauschte System eine Steigerung um etwa das Doppelte bis Dreifache. Alle diese Versuche zeigten demnach, dass unter den verschiedensten Bedingungen Fettsynthese und Glykolyse sich gleichsinnig verhielten. Gleichartige Beziehungen von Atmung und Fettsynthese konnten nicht aufgefunden werden.

IV. T A B E L L E N

Höhe der Fettsäuresynthese angegeben in Impulsen pro Minute für 10 ml Petrolätherauszug in verschiedenen Versuchsansätzen.

Mittelwerte aus mehreren Versuchen.

TABELLE I
(30 Versuche)

Sup	Sup + aAerh.	Sup + $\frac{\text{ATP}}{\text{TPN}}$	Sup + aAerh. + $\frac{\text{ATP}}{\text{TPN}}$
$1.495 \cdot 10^4$	$2.817 \cdot 10^4$	$1.822 \cdot 10^4$	$2.921 \cdot 10^4$

TABELLE II
(10 Versuche)

Sup	Sup H	Sup H + aAerh.	Sup H + $\frac{\text{ATP}}{\text{TPN}}$	Sup H + aAerh. + $\frac{\text{ATP}}{\text{TPN}}$
$1.718 \cdot 10^4$	$0.173 \cdot 10^4$	$1.016 \cdot 10^4$	$0.242 \cdot 10^4$	$1.09 \cdot 10^4$

TABELLE III
(5 Versuche)

Sup	Sup H	Sup W	Sup W + $\frac{\text{ATP}}{\text{TPN}}$
$0.817 \cdot 10^4$	$0.173 \cdot 10^4$	$0.655 \cdot 10^4$	$2.371 \cdot 10^4$

Zeichenerklärung: Sup = normaler Überstand, aAerh. = "Faktor"
 Sup H = Überstand von Hungertieren
 Sup W = Überstand von wiedergefütterten Tieren

TABELLE VIII

Sup	Sup + aAerh.	Sup + aAerh. nach 8 Tagen	Sup + aAerh. nach 14 Tagen
$1.894 \cdot 10^4$	$3.9 \cdot 10^4$	$3.4 \cdot 10^4$	$3.4 \cdot 10^4$

TABELLE IX

Sup	Sup + Dialyse- Rückstand	Sup + Dialyse- Lösung (eingedampft)
$1.364 \cdot 10^4$	$1.488 \cdot 10^4$	$0.101 \cdot 10^4$

Sup A	Sup A + Dialyse- Rückstand	Sup A + Dialyse- Lösung
$0.474 \cdot 10^4$	$1.773 \cdot 10^4$	$0.068 \cdot 10^4$

Sup	Dialysat (eingedampfte Puffer)
$1.824 \cdot 10^4$	$0.468 \cdot 10^4$

TABELLE X
(3 Versuche)

Sup	Sup + 0.08 mg NA	Sup + NA + 10 mg <u>DPN</u>
$0.744 \cdot 10^4$	$0.217 \cdot 10^4$	$0.178 \cdot 10^4$

TABELLE XI
(3 Versuche)

Sup + ATP TPN	Sup + ATP 0.08 mg TPN + NA	Sup + ATP 0.08 mg 10 mg TPN + NA + <u>DPN</u>
$1.369 \cdot 10^4$	$0.446 \cdot 10^4$	$0.331 \cdot 10^4$

TABELLE XII
(2 Versuche)

Sup + aAerh.	Sup + aAerh. + 0.08 mg NA
$1.26 \cdot 10^4$	$0.833 \cdot 10^4$

TABELLE XIII
(2 Versuche)

Sup A	Sup A + ATP TPN	Sup A + ATP TPN + 0.08 mg NA
$0.186 \cdot 10^4$	$0.833 \cdot 10^4$	$0.22 \cdot 10^4$

TABELLE XIV
(3 Versuche)

Sup	Sup NA ^{x)}	Sup NaCl	Sup NA + aAerh.	Sup NA + ATP TPN
$1.099 \cdot 10^4$	$0.311 \cdot 10^4$	$1.102 \cdot 10^4$	$0.474 \cdot 10^4$	$0.608 \cdot 10^4$

x) Zeichenerklärung: Sup NA = Überstand von mit Na gespritzten Tauben

Sup NaCl = Überstand von mit NaCl gespritzten Tauben

TABELLE XV

ATP - TESTE (♂ ATP pro ml bzw. g)

Sup	Leber	Ansatz <u>vor</u> der Inkubation	Ansatz <u>nach</u> der Inkubation	(4 Versuche)
-----	-------	-------------------------------------	--------------------------------------	--------------

179	469	291	36	
-----	-----	-----	----	--

Sup	Sup H	Sup H nach 24 Stunden	Hunger- leber	Sup A	(4 Versuche)
-----	-------	--------------------------	------------------	-------	--------------

188	35	0	185	46	
-----	----	---	-----	----	--

Sup	Sup nach 2 Stunden	Sup nach 24 Stunden	(3 Versuche)
-----	-----------------------	------------------------	--------------

180	65	16	
-----	----	----	--

TABELLE XVI

ATMUNG und GLYKOLYSE

Mittelwerte von je 3 Versuchen

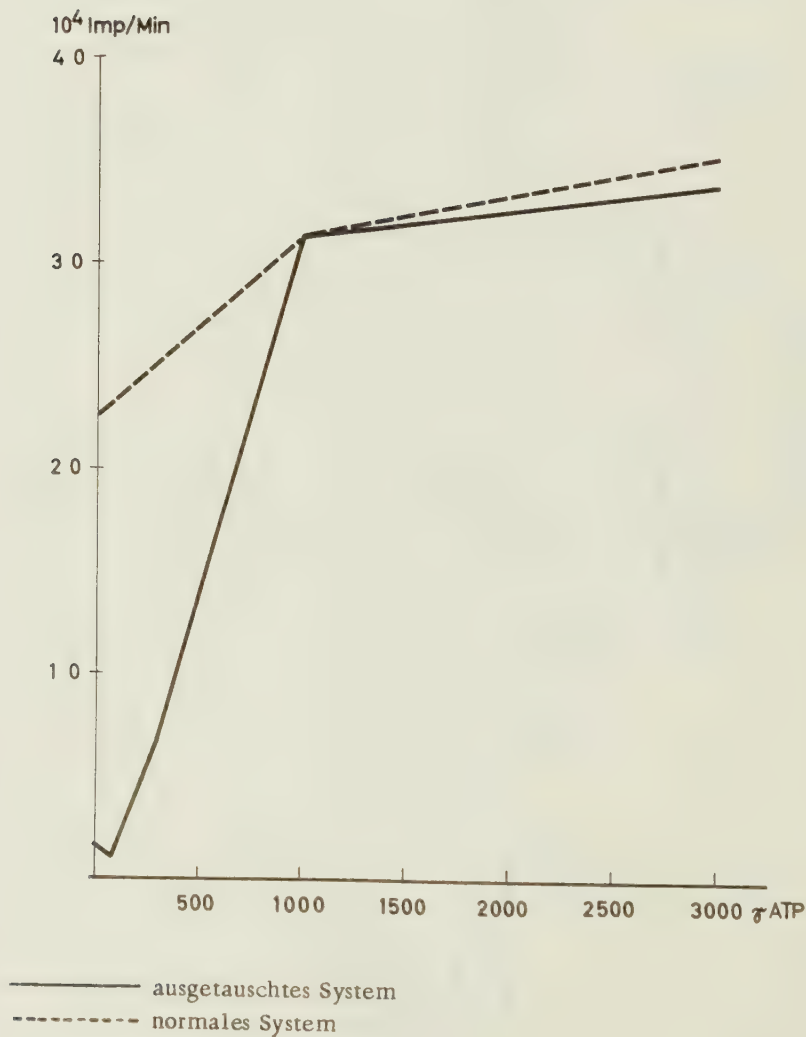
	Sup	Sup A	Sup + aAerh.	Sup A + aAerh.	Sup + ATP TPN	Sup A + ATP TPN
--	-----	-------	--------------	----------------	---------------------	-----------------------

ATMUNG	57.3	41.7				
--------	------	------	--	--	--	--

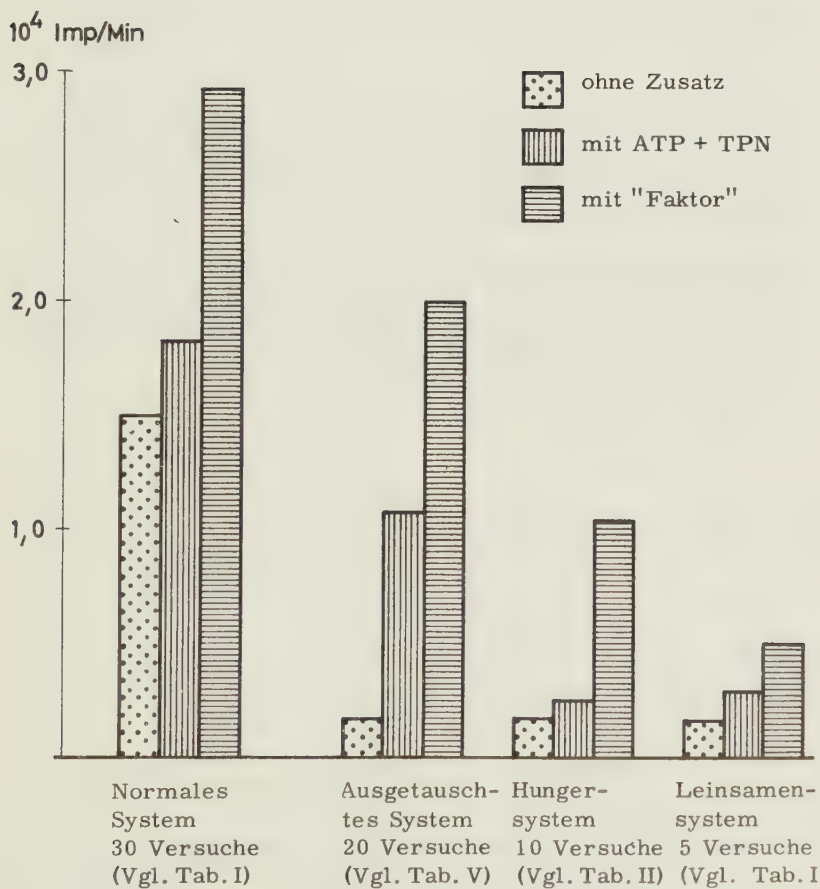
GLYKOLYSE	133.7	32.3	252.8	167.0	142.4	78.4
-----------	-------	------	-------	-------	-------	------

Figur 1

ATP-Konzentrationen und Fettsynthese.
(Vgl. Tab. VI und VII)



Figur 2



Vorliegende Arbeit konnte im Isotopenlabor der Med. Universitätspoliklinik ausgeführt werden; dafür danke ich Herrn Prof. Dr. W. Seitz herzlichst.

Er hatte es mir nicht nur in grosszügiger Weise ermöglicht, die entsprechenden Arbeiten auszuführen, sondern er hatte auch die grosse Güte, meine Arbeit mit Rat und Tat zu fördern und die abschliessende Beurteilung derselben zu übernehmen.

Frau Dr. Dr. Vera von Brand leitete mich insbesondere für den experimentellen Teil der Arbeit an. Ihr verdanke ich die theoretischen Grundlagen dieser speziellen biochemischen Fragen. Dafür erlaube ich mir Frau Dr. Dr. von Brand ergebenst zu danken.

V. LITERATURNACHWEIS

1. BRADY, R.O. and GURIN, S.:
J. of Biol. Chem. 187, 589, (1950)
2. BRADY, R.O. and GURIN, S.:
J. of Biol. Chem. 199, 421, (1952)
3. BRADY, R.O., ABDEL-MEGID MAMOON and E.R. STADTMAN:
Journal of Biol. Chemistry 222, 795, (1956)
4. BRAND, V.v. und E. HELMREICH:
Biochemische Zeitschrift 328, 146, (1956)
5. BRAND, V.v., SEITZ, W.:
Klinische Wochenschrift 36, 87, (1958)
6. CALVIN, M., C. HEIDELBERGER, B.M. TOLBERT und P.E. YANKWICH:
Isotopic Carbon. New York. J. Wiley, S.Inc.
1949
7. CHOU, T.C. and F. LIPMANN:
The Journal of Biol. Chemistry 196, 89, (1952)
8. CHANTRENNE, H. and LIPMANN, F.:
J. of Biol. Chemistry 187, 757, (1950)
9. ENTENMAN, C., S.R. LERNER, I.L. CHAIKOFF and W.G. DAUBEN:
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 70, 364,
(1949)
10. FEIGELSON, PH., WILLIAMS, I.N., ELVEHIEM, C.A.:
The Journal of Biol. Chem. 189, 361, (1951)
11. GOLDSCHMIDT, ST., REHBERG, H., V.v. BRAND und K.H.
DESING:
Chem. Ber. 90, 963, (1957)

12. HELMREICH, E., HOLZER, H., LAMPRECHT, W. und GOLD-SCHMIDT, St.: Hoppe Seyler's Zeitschrift f. physiolog. Chemie 297, 113, (1954)
13. HILZ, H., LYNEN, F.: Journal of the Am. Chem. Soc. 75c, 3285, (1953)
14. JONES, M.E., LIPMANN, F., HILZ, H. and LYNEN, F.: J. Amer. Chem. Soc. 75, 3285, (1953)
15. KORNBERG, A. and PRICER, W.E.: J. of Biol. Chem. 204, 329, 345, (1953 a, b)
16. KREBS, H.A.: Deutsche Medizinische Wochenschrift 81, 4, (1956)
17. LANGDON, G.R.: J. Americ. Chem. Soc. 77, 5190, (1955)
18. LYNEN, F.: Annual Review of Biochemistry Vol 24, 653, (1955)
19. LYNEN, F.: Klinische Wochenschrift 35, 213, (1957)
20. LYNEN, F., OCCHOA, S.: Biochimica et Biophysica acta 12, 299, (1953)
21. LYNEN, F. und DECKER, K.: Erg. d. Physiologie 49, 327, (1957)
22. POPIAK, G. and TIETZ, A.: The Biochemical Journal 60, 147, (1955)
23. SEUBERT, W. und LYNEN, F.: unveröffentlichte Versuche
24. TIETZ, A. and POPIAK, G.: The Biochemical Journal 60, 155, (1955)
25. UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. and STAUFFER, J.F.: Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism. Minneapolis, Minn. USA: Bruggess Publishing Co 1947

26. WARBURG, O.: "Wasserstoffübertragende Fermente",
Dr. W. Saenger GmbH., Berlin, 1948
(Editio Cantor, Aulendorff/Württ.)

LEBENS LAUF

Am 10.9.1932 wurde ich als Sohn des Kaufmannes Georg Wolfrum und seiner Ehefrau Emilie, geb. Robisch in Windisch-Eschenbach geboren.

Nach vierjähriger Volksschulzeit trat ich 1943 in die Oberrealschule Weiden ein, an der ich im Juni 1952 die Reifeprüfung ablegte. Das Medizinstudium begann ich in München und bestand hier 1955 die ärztliche Vorprüfung. Meinen Krankenpflagedienst leistete ich im städt. Krankenhaus in Weiden ab, meine Famulustätigkeit im Kreiskrankenhaus Erben-
dorf. Die klinischen Semester hörte ich ebenfalls alle in München, wo ich die ärztliche Prüfung am 26.3.1959 ablegte.

